

# 尼罗罗非鱼腐皮病致病菌的研究

王肇轸

徐伯亥

(南昌市水产科学研究所)

(中国科学院水生生物研究所)

## 提 要

尼罗罗非鱼的细菌性腐皮病是一种比较严重的疾病,感染率可达80%以上。本文对尼罗罗非鱼腐皮病的致病细菌的分离及毒力试验结果作了报道,并对这种细菌的形态、培养特性、生理生化等性状作了较详细的描述,确定其病原为I型嗜水产气单孢菌嗜水亚种(*Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* biotype I.)

尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)一般地说是一种抗病能力较强的鱼类,但在越冬期间或工厂化高密度养殖情况下,由于环境条件变化,水体相对变小,水温变化较大等的原因,它的抗病能力下降,死亡率增高。腐皮病就是罗非鱼的一种主要疾病。在发病严重的鱼池中,其感染率高达80%以上。

我们从南昌地区的罗非鱼越冬池中,观察到该病的主要症状是:病鱼体表腐烂,腐烂处出现圆或椭圆形的病灶,其直径一般为2×1.5厘米左右,有时可遍及鱼体全身,但多数情况主要是出现在背鳍的两侧,发病开始为体表充血,周围鳞片松动竖起,出现炎症并伴有脓血,最后腐烂成一洞穴,引起病鱼的大量死亡。张素芳(1981)<sup>(1)</sup>曾报道莫桑比克罗非鱼(*Tilapia mossambica*)的发病情况,认为是由细菌引起的,但未进行分离研究。

我们用从南昌市水产研究所越冬池搜集来的罗非鱼病鱼材料,对该病的致病细菌进行了分离培养,生理生化测定;电镜观察;并用分离到的细菌纯培养物对健康罗非鱼进行人工感染试验,得到阳性结果。初步确定此菌为I型嗜水产气单孢菌嗜水亚种(*Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* biotype I.)

## 材 料 和 方 法

### 1. 材料来源

我们先后在不同的罗非鱼越冬池中获得病鱼10尾,从肝脏和病灶处分离细菌。用作感染试验的健康罗非鱼、鲢鱼、草鱼等取自南昌市水产研究所鱼池。

### 2. 分离方法

用无菌手术,先将鱼体用75%酒精擦洗消毒,打开胸腔,用经烧灼的金属镊烫其肝部

(1) 张素芳,1981。莫桑比克罗非鱼溃疡病及其治疗。鱼病简讯,3:18—25。

的取菌部位,然后用无菌接种环伸入肝部深处取出少许肝脏组织液,作平板划线。

分离使用的培养基为胰蛋白胨琼脂培养基,其成分为:胰蛋白胨 10 克;磷酸氢二钾 2 克;琼脂 15—18 克;食盐 5 克;酵母浸膏 5 克;水 1,000 毫升;pH 为 7.2—7.4。经 15 磅压力 30 分钟的高压蒸气灭菌。

待培养基冷却至 45°C 时,倾注成平板,贮于 4°C 冰箱中待用。

接种后,在 28°C 培养箱中培养 18—24 小时,再选取单个菌落进一步进行分纯培养,冷冻干燥保存备用。

### 3. 毒力试验方法

细菌接种于普通平板培养基上,28°C 培养 18 小时。然后对鱼进行浸泡和涂抹两种方法的人工感染试验。

(1) 浸泡 用无菌生理盐水将平板上的纯培养菌洗下,在玻璃缸中稀释成含菌量分别为 3 亿个菌/毫升和 9 亿个菌/毫升的菌液,将擦去鳞片或未擦去鳞片的健康鱼,放入菌液中浸泡 18 分钟然后移入水族箱中观察。

表 1 尼罗罗非鱼腐皮病人工感染试验

菌株编号	鱼数 (尾)	发病鱼数及程度	平均水温 (°C)	浸泡感染 (分钟)时间	菌液浓度 (亿个/毫升)	观察时间 (日)
1-1	5	+++++	17-18	18	3	5
2-1	5	+++++	17-18	18	3	5
2-2	5	+++++	17-18	18	3	5
2-3	5	+++++	17-18	18	3	5
3-1	5	+++++	17-18	18	3	5
3-2	5	+++++	17-18	18	3	5
3-3	5	+++++	17-18	18	3	5
4-1	5	++++++	17-18	18	3	5
4-2	5	+++++	17-18	18	3	5
4-3	5	+++++	17-18	18	3	5
空白	5	-----	17-18	18	0	5

注: + 表示有不明显症状,无死亡; ++ 表示有明显症状并死亡; - 表示无症状无死亡。

(2) 涂抹 将上述平板培养菌,直接涂抹于擦去少许鳞片或未擦去鳞片的健康鱼体表。用无菌针头刺破青蛙腿部表皮,涂抹细菌。

### 4. 生理生化试验试剂的制备和应用

采用常规方法<sup>[1-8]</sup>。

## 结果和讨论

### 1. 毒力试验

在水温 17—18°C 时,用分离出来的 10 株菌以浸泡方法做人工感染试验,其结果见表

1. 从表中可看出用作试验的菌株都有不同程度的毒力,其中以 4-1 株毒力最强,症状与自然发病时的症状相似。

选取 4-1 菌株再分离再感染,又能从被感染的鱼体肝部再分离到这种细菌。经再感染后的菌株以 4-1-3 毒力最强(见表 2)。

表 2 再分离再感染的试验结果

菌株编号	鱼数 (尾)	发病鱼数及程度	平均水温 (°C)	感染方法	菌液浓度 (亿个/毫升)	观察时间 小时
4-1-1	10	++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++	17	剥鳞浸泡	1	19-46
4-1-2	10	+ + + + + + + + + +	17	剥鳞浸泡	1	28-58
4-1-3	10	+++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++	17	剥鳞浸泡	1	10-14
4-1-4	10	+++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++	17	剥鳞浸泡	1	14-42
空白	10	- - - - - - - - - -	17	剥鳞浸泡	0	58

注: +++:表示出现严重症状,并在短时间内死亡; ++:表示出现症状,并死亡; + 表示出现症状,缓慢死亡; - 表示无症状,无死亡。

选取 4-1-3 菌株用涂抹、浸泡两种方法同时对草鱼、鲢鱼、罗非鱼进行人工感染试验。结果这三种鱼被菌感染的部位都不同程度地出现鳞片竖起,出血发红(见表 3)。而其中罗非鱼却在一天之内死完,可见此菌对罗非鱼具有一定的专一性。

表 3 4-1-3 菌株对不同鱼的人工感染试验

鱼名	鱼数 (尾)	发病鱼数及程度	平均水温 (°C)	感染方法	感染菌液浓度 (亿个/毫升)	观察时间
草鱼	5	+ + + + +	18	浸泡涂抹	1	5日
鲢鱼	5	+ + + + +	18	浸泡涂抹	1	5日
鳊鱼	5	+ + + + +	18	浸泡涂抹	1	5日
罗非鱼	5	++ ++ ++ ++ ++	18	浸泡涂抹	1	14小时

注: + 表示出现症状,无死亡,症状与罗非鱼相同; ++ 表示出现症状并短时间内死亡。

对青蛙进行涂抹感染试验,感染处出现红肌肉型出血,未见死亡。

## 2. 细菌形态、培养特性及生理生化测定

选用 4-1-3、4-1-4 两株毒力较强的菌株进行细菌形态、培养特性及生理生化反应的观察和测定,其结果基本一致。现以 4-1-3 为代表,对其性状叙述如下:

细菌形态:短杆状,0.5—0.6×0.7—1.4 微米,中轴直形,两侧弧形,两端圆形,多数两个相联,少数单个,有运动力,极端单鞭毛,无芽孢,无荚膜,革兰氏染色阴性(见图 1)。

琼脂平板菌落:圆形,直径 1.5 毫米左右,48 小时后增至 3—4 毫米,微凸,表面光滑,边缘整齐,半透明,稍带乳白色。

琼脂斜面:生长丰盛,线型,扁平凸起,表面光滑,边缘整齐,稍带乳白色。

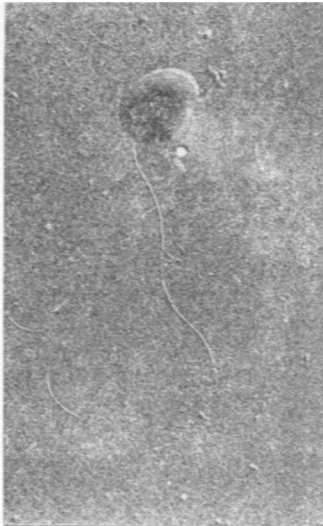


图1 I型嗜水产气单胞菌  
嗜水亚种形态( $\times 7500$ )

琼脂穿刺：生长好、念珠状，生长到底，表面部分生长。

明胶穿刺：液化。

肉汤培养：生长良好，混浊中等，表面有较厚菌膜，云雾状，8天后沉降物增多。

糖类发酵：发酵的有葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、左旋糖、水杨苷、丙三醇、甘露醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、淀粉、糊精、糖原、纤维二糖产酸产气。不发酵的有鼠李糖、侧金盏醇、阿拉伯糖、木糖、菊淀粉、棉子糖、乳糖、肌醇、卫矛醇、赤海藻糖、七叶灵。

乙醇氧化阴性；氧化酶或细胞色素氧化酶阳性；不产生脲基质；美红试验阴性；乙酰基甲基甲醇试验阳性；柠檬酸盐利用试验阳性；硝酸盐还原阴性；蛋白胨水中产氨；醋酸铅琼脂中产生硫化氢；牛乳中产碱胨化；过氧化氢酶阳性；精氨酸、天门冬酰胺、组氨酸、丝氨酸等氨基酸可作唯一碳源；葡萄糖和氨离子可作唯一碳源和氮源；在营养肉汤中 $37^{\circ}\text{C}$ 能生长；在胰蛋白酶黄豆琼脂中不产棕色素；氯化钠7.5%营养肉汤中不生长；2·3丁二醇反应阳性；赖氨酸脱羧酶反应阴性；以及葡萄糖酸盐氧化酶试验阳性(见表4)。

表4 4-1-3菌株与I型嗜水产气单胞菌嗜水亚种的生理生化性状比较

测定项目	4-1-3	I型
在 $37^{\circ}\text{C}$ 肉汤中生长	+	+
胰蛋白酶黄豆琼脂中产色素	-	-
葡萄糖和铵盐可作唯一氮碳源	+	+
可作唯一碳源的氨基酸		
L-精氨酸	+	+
L-天门冬酰胺	+	+
L-组氨酸	+	+
L-谷氨酸	-	+
L-丝氨酸	+	+
L-苯丙氨酸	-	d
在含7.5%氯化钠的肉汤中生长	-	-
2,3丁二醇脱氢酶	+	+
甘油产气	+	+
葡萄糖产气	+	+
含0.1%色氨酸的胰胨产吲哚	-	+
2.5%胨水产硫化氢	+	+
赖氨酸脱羧酶反应	-	-
乙酰基甲基甲醇试验	+	+ -
葡萄糖酸盐氧化酶	+	+ -
分解半乳糖	+	+
分解蔗糖	+	d
分解甘露醇	+	+
分解阿拉伯糖	-	d
分解七叶灵	-	d

注：+为阳性；-为阴性；d为不规则反应。

根据以上特性，与伯杰氏细菌鉴定手册第八版中所述的性状相比，<sup>[4,5]</sup>该菌应属 I 型嗜水产气单孢菌嗜水亚种 (*Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* biotype I.)。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 王德铭, 1958. 皖青鱼烂鳃及赤皮病致病菌的研究. 水生生物学集刊, 9-25.
- [ 2 ] 中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1978. 一般细菌常用鉴定方法. 科学出版社.
- [ 3 ] 徐伯亥等, 1980. 鲢鳙鱼的打印病致病菌的研究. 海洋与湖沼, 11(1): 85-93.
- [ 4 ] Breed, R. S. *et al.*, 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed, London.
- [ 5 ] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams & Wilkins Company, Baltimore. 345-348.

## STUDIES ON THE PATHOGENIC BACTERIA OF THE "ROTTEN-SKIN" DISEASES OF THE NILE TILAPIA (*TILAPIA NILOTICA*)

Wang Zhaogan

(Nanchang Fisheries Research Institute)

Xu Bohai

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

### Abstract

"Rotten skin" is one of the bacterial fish diseases, its infection rate reaches to 80%, which causes great loss of Nile-tilapia in the wintering ponds in some districts of China.

The major symptom of the diseased fish is that, the shape of erosion on the skin is either circular or elliptic. Most of the erosions appear on both sides of the dorsal fin, sometimes scatter on all parts of the body. In its early stages, the surface of the body appears to be filled with blood, the scales around them begin to loosen and erect up, gradually it rots to a hole, at last causes the death of the fish. The bacterium was isolated from the liver and focus of diseased fish, and artificial infection with pure cultures shows positive. The bacterium is a short rod  $0.5-0.6 \times 0.7-1.4 \mu\text{m}$  long, with rounded ends, with a polar motile flagellum, nonsporulating, and Gram-negative in its stain reactions. Produces gas from glucose, glycerol, galactose and mannitol; Veys-Proskauer reaction positive; oxidizes gluconic acid. According to morphology, cultural character as well as physiology and biochemistry reactions fit well to characteristics of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* biotype I, which is presented in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed. *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* biotype I should be considered as a agent for the "Rotten-skin" disease of Nile-tilapia.